

EVALUASI KERAGAMAN GENETIK PLASMA NUTFAH KELAPA GENJAH DI KEBUN PERCOBAAN MAPANGET BERDASARKAN PENANDA DNA SSRs (*Simple Sequence Repeats*)

JEANETTE KUMAUNANG, ISMAIL MASKROMO dan ENGELBERT MANAROINSONG

Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain
Jl. Bethesda II, Mapanget, Kotak Pos 1004, Manado 95001

ABSTRAK

Keragaman genetik sangat penting dalam program pemuliaan kelapa. Penelitian ini bertujuan untuk mempelajari keragaman genetik plasma nutfah kelapa Genjah yang ditanam secara *ex situ* di kebun koleksi Mapanget, Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain, Manado. Delapan aksesi kelapa Genjah dianalisis keragamannya berdasarkan penanda DNA SSRs menggunakan 3 primer atau lokus. Hasil analisis menunjukkan bahwa 3 primer SSRs yang digunakan semuanya polimorfik dan menghasilkan 4 - 5 alel per lokus. Kelapa Genjah Salak (GSK) menunjukkan heterozigous pada ke tiga lokus, sedangkan Genjah Hijau Jombang (GHJ) pada lokus CNZ 51. Dua pohon sampel dari masing-masing aksesi yang dianalisis memiliki kemiripan genetik sebesar 100% kecuali aksesi (GHJ) yang hanya memiliki kemiripan 93 %. Aksesi GSK yang sangat berbeda dengan aksesi lainnya dengan kemiripan hanya 45%. Hal ini menunjukkan bahwa aksesi kelapa GSK dan GHJ memiliki beberapa karakter yang berbeda dan spesifik dibandingkan dengan aksesi lainnya, sehingga diperlukan seleksi yang ketat sebelum digunakan sebagai materi pemuliaan

Kata kunci : Kelapa, *Cocos nucifera* L., plasma nutfah, keragaman genetik, kelapa Genjah, penanda DNA SSRs, Sulawesi Utara

ABSTRACT

Genetic diversity evaluation of dwarf coconut germplasm at Mapanget Experimental Garden based on SSRs (Simple Sequence Repeats) marker

Genetic diversity is very important in coconut breeding program. The aim of this research was to study genetic diversity of Dwarf Coconut that have been planted on Mapanget Experimental Garden, Indonesian Coconut and Palmae Research Institute Manado. Eight Dwarf accessions were analyzed their to find out genetic diversity based on SSRs marker using three primers or locus. The results showed that three primers SSRs were polymorphic and gave 4 -5 alleles per locus. Salak Green Dwarf (SGD) showed heterozygous in three loci, while Jombang Green Dwarf (JGD) in locus CNZ 51. Two sample plants of each accession had genetic similarity 100% except JGD only had similarity of 93%. SGD was different with other accessions and only had genetic similarity of 45%. SGD and JGD had several and specific characters that were different compared to the other accessions and have to be selected before they are used as breeding materials.

Key words : Coconut, *Cocos nucifera* L., germplasm, genetic diversity dwarf coconut, marker SSRs

PENDAHULUAN

Plasma nutfah kelapa merupakan sumber materi genetik untuk merakit kelapa unggul dan untuk program

pemuliaan kelapa lainnya. Sebelum digunakan untuk program pemuliaan, plasma nutfah perlu dievaluasi keragaman genetiknya. Evaluasi plasma nutfah sangat berguna dalam seleksi materi genetik dan menentukan arah pemuliaan.

Sampai dengan tahun 2001 telah dikoleksi kurang lebih 105 aksesi kelapa yang ditanam di beberapa kebun koleksi plasma nutfah kelapa. Kebun koleksi Mapanget Sulawesi Utara memiliki kurang lebih 54 aksesi yang terdiri dari 41 aksesi kelapa Dalam dan 13 aksesi kelapa Genjah. Beberapa di antaranya telah digunakan dalam perakitan kelapa hibrida dan kelapa unggul lainnya (NOVARIANTO, 2000).

Evaluasi keragaman genetik plasma nutfah tanaman dapat dilakukan berdasarkan karakteristik morfologi, sitologi, biokimia dan molekuler. Penanda morfologi merupakan penanda yang sangat sederhana, murah dan mudah dalam pelaksanaannya. Namun demikian beberapa karakter tanaman cenderung dipengaruhi lingkungan sehingga mengurangi keakuratannya. Evaluasi keragaman genetik plasma nutfah kelapa di kebun koleksi Mapanget berdasarkan karakter morfologi telah dilakukan oleh NOVARIANTO, *et al.* (1999).

Penggunaan isozim merupakan salah satu analisis yang dapat mendeteksi keragaman genetik seperti yang dilakukan CARDENA *et al.* (1998). Namun hasilnya belum efektif untuk melihat keragaman genetik pada tanaman kelapa, karena beberapa protein mengalami variasi yang disebabkan oleh modifikasi sesudah translasi. Selain itu adanya keterbatasan jumlah isoenzim yang dapat digunakan sebagai pembeda tanaman, menyebabkan metode ini mulai ditinggalkan.

Seiring dengan perkembangan teknologi, telah ditemukan penanda DNA, yang tidak dipengaruhi oleh lingkungan maupun umur tanaman. Informasi genetika berdasarkan penanda DNA dapat dilakukan dengan RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) dan *Simple Sequence Repeats* (SSRs) atau *microsatellite* (KARP *et al.*, 1997). Masing-masing penanda memiliki kelebihan dan kekurangan dalam hubungan dengan teknis pelaksanaan, biaya operasional maupun keakuratan data yang dihasilkan,

sehingga pemilihan metode yang digunakan, selain berdasarkan tujuan penggunaannya juga perlu mempertimbangkan biaya dan faktor lain seperti kemudahan dalam pelaksanaan, dukungan peralatan laboratorium serta keakuratan data untuk data base (KARP, 1999).

Penggunaan penanda DNA untuk mempelajari keragaman genetik plasma nutfah kelapa telah dilakukan oleh beberapa peneliti sebelumnya. Salah satu penanda yang telah banyak digunakan pada kelapa adalah RAPD (ROHDE *et al.*, 1995; ASHBURNER *et al.*, 1997). RAPD telah digunakan untuk mempelajari keragaman genetik aksesi kelapa Genjah di Indonesia (LENGKONG *et al.*, 1998 ; HAYATI *et al.*, 2000) dan pada aksesi kelapa Dalam (PANDIN, 2000). Kelebihan penanda ini adalah mudah dalam pelaksanaan dan relatif murah biaya operasionalnya. Namun keakuratannya agak kurang karena pola pita yang dihasilkan cenderung tidak konsisten dan resolusinya rendah, sehingga menyebabkan keragu-raguan dalam skoring data.

Penanda RFLP telah digunakan oleh TEULAT *et al.* (2000) dan LEBRUN *et al.* (1998) untuk mempelajari keragaman genetik aksesi kelapa yang berasal dari berbagai negara. Metode ini dapat memberikan informasi keragaman genetik yang cukup baik, namun teknik pelaksanaannya yang relatif sulit dan biaya operasional yang relatif mahal sehingga saat ini jarang digunakan.

Simple Sequence Repeats (SSRs) merupakan salah satu penanda yang mulai banyak digunakan sebagai penciri genetik (*fingerprinting*) dan dalam mempelajari keragaman genetik. SSRs memiliki polimorfisme dan resolusi lebih tinggi jika dibandingkan penanda DNA lainnya (TEULAT *et al.*, 2000). Primer spesifik hanya mengamplifikasi sekuens tertentu saja, sehingga dapat meningkatkan keakuratan deteksi sekuens DNA yang mirip atau berbeda antar individu. Karena tingkat keakuratan yang tinggi (*reproducibility*), metode SSRs dapat dilakukan oleh peneliti berbeda dengan hasil yang relatif sama (KARP *et al.*, 1997). Dengan keunggulan-keunggulan tersebut, penanda SSR menjadi penanda standar yang disyaratkan organisasi pengelola plasma nutfah kelapa Internasional COGENT (The International Coconut Genetic Resources Network) dalam karaktersisasi plasma nutfah kelapa negara-negara anggotanya. Sehingga untuk melengkapi database dan pertukaran data DNA kelapa, digunakan data hasil analisis menggunakan penanda SSRs (RIVERA *et al.*, 1999 dan TEULAT *et al.*, 2000).

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biologi Tumbuhan, Pusat Studi Ilmu Hayati LP-IPB Bogor, berlangsung dari Oktober sampai Desember 2004. Analisis DNA dilakukan terhadap delapan aksesi kelapa Genjah

yaitu Genjah Kuning Nias (GKN), Genjah Raja (GRA), Genjah Hijau Nias (GHN), Genjah Tebing Tinggi (GTT), Genjah Kuning Bali (GKB), Genjah Salak (GSK), Genjah Orange Sagerat (GOS) dan Genjah Hijau Jombang (GHJ) yang dikoleksi secara *ex situ* di Kebun Koleksi Mapanget Balai Penelitian Tanaman Kelapa dan Palma Lain, Manado. Masing-masing aksesi diambil 2 pohon sampel secara acak. Sampel daun untuk isolasi DNA diambil dari pelepah daun No.2 atau No. 3 .

Isolasi DNA dilakukan mengikuti metode ROHDE *et al.* (1995) yang telah dimodifikasi LENGKONG (1998). Sebanyak 2 gram daun kelapa yang masih muda dimasukkan dalam mortar yang berisi 10 ml penyangga lisis (100 mM Tris-HCl pH 8,2% (m/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, dan 0,2% β -mercaptoetanol ditambahkan pada saat akan isolasi) dan 0,07 g pasir kuarsa, selanjutnya digerus sampai halus. Cairan/serbuk daun dipindahkan ke dalam tabung 15 ml dan diinkubasi pada suhu 65°C selama 1 jam. Suspensi DNA dipanen dengan melakukan sentrifuse pada 4000 rpm selama 15 menit, dilanjutkan dengan ekstraksi 1 volume kloroform : isoamil alkohol (24 :1). DNA di dalam suspensi dipresipitasi dengan menambahkan 0,1 volume sodium asetat 3M pH 5,2 dan 0,8 volume isopropanol. Endapan DNA yang dihasilkan melalui sentrifuse 4000 rpm selama 15 menit, dicuci dengan etanol 70%, dikeringkan, dan DNA disuspensi dalam 500 μ l larutan TE 1X. Kontaminan RNA dihilangkan dengan cara suspensi DNA ditambahkan *Rnase* 5 μ l dengan konsentrasi akhir 1000 μ g/ml dan inkubasi pada suhu 37°C selama 1 jam. Suspensi DNA diekstraksi berturut-turut dengan fenol, kemudian dengan 1 volume kloroform : isoamil alkohol (24:1). Tahapan berikut adalah presipitasi sampai tahap mensuspensi DNA yang prosedurnya sama dengan langkah sebelumnya.

Penetapan kuantitas dan kualitas atau kemurnian DNA akan diukur menggunakan spektrofotometer (Cecil CE 2020) pada panjang gelombang 260 nm dan 280 nm. DNA mempunyai kemurnian yang tinggi bila rasio nilai absorbansi 260 nm dengan 280 nm berkisar antara 1.8 – 2.0. Konsentrasi DNA dihitung berdasarkan rumus : pengenceran x nilai absorbansi 260 nm x 50 μ g/ml.

Penelitian ini menggunakan 3 primer yang didisain oleh RIVERA (1999) yaitu CNZ 18, CNZ 21 dan CNZ 51. Amplifikasi DNA menggunakan mesin PCR (Gene Amp PCR System 2400 Perkin Elmer). Campuran reaksi sebanyak 25 μ l mengandung 10 ng (10 μ l) DNA Genom, 0,2 μ M (2 μ l) primer *forward* dan primer *reverse*, 0,5 μ l dNTP (Promega), 0,5U (0.15 μ l) Tag DNA polymerase, 1x buffer PCR (2.5 μ l), dan ultra purewater (H₂O) steril. PCR dilakukan menggunakan 35 siklus pada suhu denaturasi 94°C selama 40 detik, penempelan primer pada suhu 55°C selama 1 menit, pemanjangan primer pada suhu 72°C selama 2 menit dan pemanjangan akhir pada suhu 72°C selama 10 menit.

Sebanyak 3,5 µl hasil PCR diload pada masing-masing sumur gel elektroforesis poliakrilamid. Elektroforesis dilakukan pada konstan daya sebesar 75 W selama 45 menit sampai 1 jam. Alat elektroforesis vertikal yang digunakan adalah tipe IM3038 hasil rakitan MASKROMO (2005).

Pewarnaan DNA dilakukan dengan *silver staining*. Kaca yang ditemplei gel berisi DNA direndam dalam baki berisi 10% asam asetat glasial (larutan fiksasi) digoyang selama 20 menit. Kaca dicuci dalam air bebas ion selama dua kali masing-masing 2 menit. Kaca direndam dalam larutan pewarna (*silver staining*) di atas mesin penggoyang selama 1 jam, kemudian dibilas dalam air bebas ion selama 10 detik. Kaca kemudian direndam dalam larutan developer sehingga akan muncul pita-pita. Setelah itu secepatnya direndam dalam larutan asam asetat selama 5 menit, dibilas dengan air bebas ion dan dikeringanginkan. Selanjutnya gel discan dan dilakukan skoring.

Data hasil analisis SSRs diamati berdasarkan ada atau tidaknya pita. Pita DNA polimorfisme merupakan pita DNA hasil amplifikasi yang tidak dimiliki oleh individu kelapa yang lain. Setiap posisi pita DNA berkorespondensi dengan alel tertentu. Pita-pita yang diperoleh diubah ke dalam bentuk data biner dengan memberi nilai satu (1) jika ada pita dan nol (0) jika tidak ada pita. Data tersebut juga dikonversi menjadi data genotipe untuk menghitung jumlah alel dan nilai heterozigositas menggunakan program POPGENE dan FStat.

Data biner yang diperoleh digunakan untuk menyusun matriks kesamaan genetik berdasarkan rumus NEI dan LI (1979) sebagai berikut :

$$F_{ab} = \frac{2 n_{ab}}{n_a + n_b}$$

F_{ab} adalah nilai kesamaan genetik antara individu tanaman a dan b

n_{ab} adalah jumlah pita yang sama posisinya pada individu a dan b

n_a dan n_b adalah jumlah pita pada masing-masing individu a dan b

Berdasarkan nilai kesamaan genetik tersebut, dilakukan analisis pengelompokan data matriks (*cluster analysis*) dan pembuatan dendrogram menggunakan metode *Unweighted Pair-Group Method Arithmetic* (UPGMA) melalui program *Numerical Taxonomy and Multivariate System versi 2.02* (NTSYS)

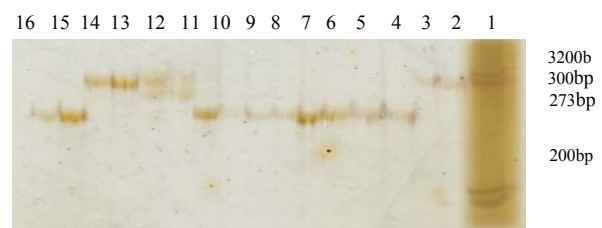
HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil analisis DNA SSRr aksesi kelapa Genjah menunjukkan bahwa ketiga primer yang digunakan memiliki polimorfisme dengan ukuran alel yang bervariasi. Polimorfisme berhubungan dengan kemampuan primer

untuk membedakan individu tanaman dalam suatu populasi yang diamati. Untuk mempelajari keragaman genetik hanya primer yang polimorfik yang digunakan. Ukuran alel dari aksesi kelapa Genjah menggunakan primer CNZ 18 berkisar antara 110 – 138 bp. Untuk primer CNZ 12 sebesar 273 – 320bp, sedangkan primer CNZ 51 ukuran alelnya sebesar 185 – 220bp (Gambar 1). Kisaran ukuran alel ini sesuai dengan yang diperoleh AKUBA (2002) yang menganalisis kelapa Dalam komposit di Filipina dan kelapa Dalam Mapanget asal Sulawesi Utara menggunakan ketiga primer yang sama penelitian ini.

Primer CNZ 21 dan CNZ 51 memiliki jumlah alel lebih tinggi dibanding primer CNZ 18. Kedua primer tersebut memiliki 5 alel sedangkan CNZ 18 sebanyak 4 alel. Jumlah alel lebih sedikit dibandingkan dengan hasil analisis TEULAT *et al.* (2000) yang menggunakan primer CNZ 21 dalam analisis terhadap aksesi kelapa dari berbagai negara (14 alel). Jumlah alel berhubungan dengan keragaman genetik antar individu dalam populasi. Aksesi kelapa Genjah yang menyerbuk sendiri (*selfing*) menyebabkan derajat homozigositas tinggi dan keragamannya rendah. Untuk dua pohon yang diamati pada masing-masing aksesi memiliki jumlah alel yang sama.

Nilai heterozigositas sebesar 1.0 diperoleh pada aksesi GSK untuk ketiga primer atau lokus yang digunakan, sedangkan untuk GHJ sebesar 0.5 hanya pada primer CNZ 51 (Tabel 1). Nilai heterozigositas adalah proporsi lokus heterosigot dari total individu masing-masing aksesi yang diamati. Semakin tinggi nilai heterozigositas suatu aksesi, maka semakin tinggi keragaman aksesi atau populasi yang diamati. Nilai heterosigositas 1.0 menunjukkan sangat beragamnya individu yang diamati berdasarkan lokus yang uji. Sedangkan nilai heterozigositas sebesar 0.0 menunjukkan kehomozigotan individu yang diamati. Pada ke-delapan aksesi yang diamati ini menunjukkan bahwa



Gambar 1. Pola pita DNA SSRs 16 sampel kelapa Genjah menggunakan Primer CNZ 21

Figure 1. Profile of DNA bands SSRs of 16 samples dwarf coconut made of Primer CNZ 21

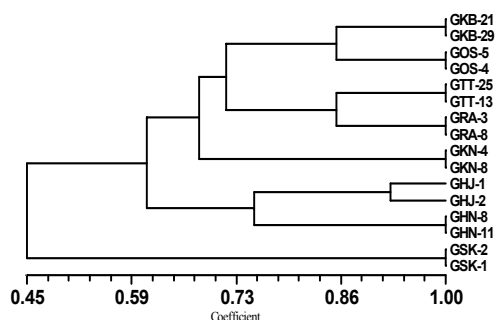
Keterangan	: 1 = GKB 21	2 = GKB 29	3 = GTT 25
Note	: 4 = GTT 13	5 = GOS 5	6 = GOS 4
	7 = GRA 3	8 = GRA 8	9 = GKN 4
	10 = GKN 8	11 = GSK 2	12 = GSK 1
	13 = GHJ 1	14 = GHJ 1	15 = GHN 8
	16 = GHN 11		

Tabel 1. Nilai heterozigositas delapan aksesi kelapa berdasarkan tiga primer SSRs
 Table 1. Value of heterozygosity of eight coconut accessions using SSRs primers

Primer/ Lokus	Aksesi Kelapa							
	GKB	GTT	GOS	GRA	GKN	GSK	GHJ	GHN
CNZ 18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
CNZ 21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0
CNZ 51	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0

aksesi GKB, GTT, GOS, GRA, GKN dan GHN menunjukkan derajat kehomozigotan yang tinggi untuk ke-tiga primer atau lokus yang digunakan. Derajat kehomozigotan berhubungan dengan rendahnya keragaman antar individu dalam populasi. Tingginya nilai heterozigositas pada aksesi GSK menunjukkan bahwa aksesi tersebut memiliki keragaman yang relatif tinggi, sehingga untuk seleksi mendapatkan tanaman yang seragam harus melalui seleksi yang ketat. Nilai heterozigositas yang tinggi pada aksesi kelapa Genjah kemungkinan disebabkan oleh penyerbukan silang yang telah terjadi pada pohon induk atau pohon asal aksesi kelapa tersebut (TEULAT *et al.*, 2000). Pola pembungaan tipe kelapa Genjah yang cenderung menyerbuk sendiri, masih memiliki peluang terjadinya penyerbukan silang sebesar 1 - 5% (SANTOS *et al.*, 1997).

Hasil analisis kemiripan genetik antar pohon terhadap delapan aksesi kelapa Genjah menggunakan tiga primer SSRs menunjukkan bahwa dua pohon sampel dari masing-masing aksesi yang dianalisis memiliki kemiripan genetik sebesar 100% kecuali aksesi (GHJ) yang hanya memiliki kemiripan 93% (Gambar 2).



Gambar 2. Dendrogram kemiripan genetik 8 aksesi kelapa Genjah berdasarkan penanda DNA SSR menggunakan Primer CNZ 18, CNZ 21 dan CNZ 51

Figure 2. Dendrogram of genetic similarity of 8 accessions based on DNA SSR marker using CNZ 18, CNZ 21, and CNZ 51 primers

Hasil analisis menggunakan penanda DNA RAPD dengan 10 primer acak terhadap populasi kelapa Genjah Hijau Jombang (GHJ) yang dikoleksi di kebun Mapanget Sulawesi Utara menunjukkan kemiripan genetik sebesar 78% -93% (HAYATI *et al.*, 2000). Dengan penanda yang sama LENGKONG *et al.* (1998) berhasil menunjukkan kemiripan genetik aksesi GOS sebesar 78%, GKB 83% dan GKN 86%. Hasil tersebut menunjukkan bahwa penanda DNA RAPD memperlihatkan keragaman yang tinggi antar individu pada setiap aksesi kelapa Genjah yang diamati. Hal ini disebabkan oleh karena penanda RAPD menggunakan primer acak yang memungkinkan terdeteksinya keragaman yang diakibatkan oleh penempelan secara acak primer yang relatif pendek dan tidak spesifik pada sepanjang utas DNA. Sehingga individu yang secara genotipe sama, mungkin saja terdeteksi berbeda dengan penanda RAPD. Berbeda dengan penanda SSRs yang menggunakan primer spesifik, sekuen yang teramplifikasi atau terdeteksi untuk penempelan primer hanya yang spesifik atau benar-benar komplemennya. Sehingga penanda SSRs dapat menunjukkan kemiripan yang tinggi antar individu yang secara genotipe sama.

Berdasarkan Gambar 1 juga terlihat kemiripan genetik sebesar 86% ditunjukkan oleh aksesi GKB dan GOS, juga antara GTT dan GRA. Selain itu ke delapan aksesi kelapa Genjah tersebut membentuk 3 kelompok besar. Kelompok I terdiri dari GKB, GOS, GTT, GRA dan GKN dengan tingkat kemiripan 68%, sedangkan pada kelompok II terdiri dari GHJ dan GHN dengan kemiripan 75%. Yang menarik adalah satu aksesi kelapa yaitu GSK terpisah dan berbeda sekali dengan kedua kelompok sebelumnya dengan kemiripan hanya 45%. Hal ini menunjukkan adanya kespesifikan sifat genetik aksesi GSK tersebut dibandingkan dengan ke tujuh aksesi lainnya. Hasil ini sejalan dengan hasil penelitian NOVARIANTO *et al.* (1999) yang mengamati keragaman genetik 8 aksesi kelapa Genjah yang sama di kebun koleksi plasma nutfah Mapanget, Sulawesi Utara berdasarkan penanda morfologi. Aksesi GHN menunjukkan kemiripan genetik secara morfologi sebesar 50% dengan aksesi GKN, GTT, GKB, GHJ, GOS dan GRA, sedangkan aksesi GSK hanya memiliki kemiripan 10% dengan aksesi lainnya. Kemiripan genetik antar individu dalam populasi menunjukkan tingkat keseragamannya baik secara genotipe maupun morfologi. Sedangkan kemiripan genetik antar aksesi atau populasi menunjukkan hubungan kekerabatannya. Informasi tersebut sangat dibutuhkan dalam program pemuliaan selanjutnya seperti seleksi dan hibridisasi untuk perakitan kelapa unggul.

KESIMPULAN

Tiga primer SSRs yang digunakan semuanya polimorfik dan menghasilkan 4 – 5 alel per lokus. Kelapa Genjah Salak (GSK) menunjukkan heterozigot pada ke tiga lokus, sedangkan Genjah Hijau Jombang (GHJ) pada lokus CNZ 51. Dua pohon sampel dari masing-masing aksesori yang dianalisis memiliki kemiripan genetik sebesar 100% kecuali aksesori (GHJ) yang hanya memiliki kemiripan 93%. Aksesori GSK yang sangat berbeda dengan aksesori lainnya dengan kemiripan hanya 45%. Hal ini menunjukkan bahwa aksesori kelapa GSK dan GHJ memiliki beberapa karakter yang berbeda dan spesifik dibandingkan dengan aksesori lainnya, sehingga diperlukan seleksi yang ketat sebelum digunakan sebagai materi pemuliaan.

SARAN

Untuk mendapatkan data yang lebih akurat dan lengkap tentang keragaman genetik plasma nutfah kelapa Genjah, maka penelitian ini perlu dilanjutkan dengan menganalisis lebih banyak individu (minimal 10 individu) setiap aksesori, dengan menggunakan lebih banyak primer SSRs (minimal 10 primer).

DAFTAR PUSTAKA

- AKUBA RH. 2002. Breeding and population genetics studies on coconut (*Cocos nucifera* L.) composite variety using morphological and microsatellite markers. Disertasi Doctor of Philosophy. University of the Philipines Los Banos.
- ASHBURNER, GR., W.K. THOMPSON, and G.M. HALLORAN. 1997. RAPD analysis of South Pasific coconut palm population. *Crop Science* 39 : 992-997.
- CARDENA, R., C. OROPEZA and D. ZIZUMBO. 1998. Leaf protein as marker useful in the genetic improvement of coconut palms. *Euphytica*. 102: 81-86.
- HAYATI, P.K., A. HARTANA, SUHARSONO dan H. ASWIDINNOOR, 2000. Keanekaragaman genetik kelapa Genjah Jombang berdasarkan random amplified polymorphic DNA. *Hayati*. 7 (2) : 35 -40.
- KARP, A, S. KRESNOVICH, KV. BHAT, WG. AYAD and T. HODGKIN 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation : a guide to the technologies. IPGR. Rome. 46p.
- KARP, A. 1999. The use of polymorphic microsatellites for assessing genetic diversity in coconut. *In* C. Oropeza, J.L. Verdiel, GR. Ashburner, R Cardena, JM. Samantha. Editors. Current advances in coconut biotechnology. *Curret Plant Science and Biotechnology in Agriculture* Kluwer Academic Publisher London. p. 121-130.
- LEBRUN, P., Y.P. N. 'CHO, M. SEGUIN, L. GRIVET dan L. BOUDOUIN. 1998. Genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera* L.) revealed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Euphytica*. 101 : 103 – 108.
- LENGKONG, E.F., A. HARTANA dan SUHARSONO. 1998 Keragaman beberapa kultivar kelapa berdasarkan penanda RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) hal 1-12. *Dalam* N. Sugiri, W.G. Piliang, M.P. Tampubolon, A. Hartana, I. Sudirman, K.G Wiryawan dan A. Gunawan (Ed). *Prosiding Seminar Sehari Hasil-hasil Penelitian Bidang Ilmu Hayat*. PAU Ilmu hayati. IPB Bogor 3 September.
- MASKROMO, I. 2005. Kemiripan genetik populasi kelapa berbuah kopyor berdasarkan karakter morfologidan penanda SSSr (*Simple Sequence Repeats*) Tesis S2. Program Pascasarjana IPB. 35p.
- NOVARIANTO H, KUMAUNANG J dan MASKROMO I. 1999. Keragaman morfologi plasma nutfah kelapa. *Bulletin Palma*. 25. :31 -38.
- NOVARIANTO. H, 2000. Status plasma nutfah kelapa dan palma lain. Laporan Balitka untuk Puslitbangbun. Bogor.
- PANDIN. D.S., 2000. Kemiripan genetik populasi kelapa Dalam Mapanget, Tenga, Bali, Palu, dan Sawarna berdasarkan penanda RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Tesis S2. Program pascasarjana IPB. 45p.
- RIVERA R., K.J. EDWARD, J.H.A. BARKER, G.M. ARNOLD, G. AYAD, T. HODGKIN, and A. KARP 1999. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in *Cocos nucifera* L. *Genom*. 42: 668 – 675.
- ROHDE, W., A. KULLAYA, J. RODRIGUEZ, and E. RITTER. 1995. Genome analysis of *Cocos nucifera* L by PCR Amplification of spacer sequences separating a subset of copis-like EcoRI repetitive elements. *J.Genet. and Breed*. 49 : 170 -186.
- SANTOS, GA, BATUGAL PA, OTHMAN A, BAUDOUIN L, and LABOISSE JP, EDITOR. 1997. Manual standardized research techniques in coconut breeding. Malaysia IPGRI-COGENT. 96p.
- TUELAT B. C. ALDAM, R. TREHIN, P. LEBRUN, J.H.A. BARKER, G.M. ARNOLD, A. KARP, L. BOUDOUIN, F. ROGNON. 2000. An analysis of genetic diversity in coconut (*Cocos nucifera*) population from across the geographic range using sequence-tagged microsatellites (SSRs) and AFLPs. *Theory Application Genetic*. 100 : 764 – 771.